

B42

PCT

世界知识产权组织
国际局



按照专利合作条约(PCT)所公布的国际申请

<p>(51) 国际专利分类号⁶: C12N 15/56, 9/36, C07K 16/40</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国际公布号: WO00/12722 (43) 国际公布日: 2000年3月9日(09.03.2000)</p>
<p>(21) 国际申请号: PCT/CN99/00131 (22) 国际申请日: 1999年8月30日(30.08.1999) (30) 优先权: 98111039.8 1998年8月31日(31.08.1998) CN (71)(72) 发明人/申请人: 余龙(YU, Long) [CN/CN]; 中国上海市邯郸路220号复旦大学遗传学研究所, 邮政编码: 200433, Shanghai (CN). (72) 发明人; 及 (75) 发明人/申请人(仅对美国): 傅强(FU, Qiang) [CN/CN]; 赵勇(ZHAO, Yong) [CN/CN]; 张宏来(ZHANG, Hong-lai) [CN/CN]; 毕安定(BI, Anding) [CN/CN]; 中国上海市邯郸路220号复旦大学遗传学研究所, 邮政编码: 200433, Shanghai (CN). (74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号, 邮政编码: 200233, Shanghai (CN).</p>	<p>(81) 指定国: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG) 本国际公布: 包括国际检索报告。</p>	
<p>(54) Title: A NOVEL HUMAN LYSOZYME GENE, ITS ENCODING POLYPEPTIDE AND THE METHOD PREPARING FOR THEM (54) 发明名称: 一种新的人溶菌酶基因、其编码的多肽及其制备方法 (57) Abstract The invention relates to a member LYC2 of a novel lysozymes gene family. The invention provides the cDNA sequence encoding for the novel lysozyme, the polypeptide encoded by the sequence, as well as the method producing said novel human lysozyme utilising recombinant technology. The invention also provides the use of the novel human lysozyme.</p>		

(57) 摘要

本发明涉及了一种新的溶菌酶基因家族的成员 LYC2。本发明提供了该新溶菌酶的 cDNA 编码序列、该序列编码的多肽，以及利用重组技术生产所述的新的溶菌酶的方法。本发明还提供了这种新人溶菌酶的应用。

以下内容仅供参考

在按照PCT所公布的国际申请小册子首页上所采用的PCT成员国国家代码如下：

AE 阿拉伯联合酋长国	DK 丹麦	KP 朝鲜民主主义人民共和国	RO 罗马尼亚
AG 安提瓜和巴布亚	DM 多米尼加	KR 韩国	RU 俄罗斯联邦
AL 阿尔巴尼亚	DZ 阿尔及利亚	KZ 哈萨克斯坦	SD 苏丹
AM 亚美尼亚	EE 爱沙尼亚	LC 圣卢西亚	SE 瑞典
AT 奥地利	ES 西班牙	LI 列支敦士登	SG 新加坡
AU 澳大利亚	FI 芬兰	LK 斯里兰卡	SI 斯洛文尼亚
AZ 阿塞拜疆	FR 法国	LR 利比里亚	SK 斯洛伐克
BA 波斯尼亚-黑塞哥维那	GA 加蓬	LS 莱索托	SL 塞拉利昂
BB 巴巴多斯	GB 英国	LT 立陶宛	SN 塞内加尔
BE 比利时	GD 格洛纳达	LU 卢森堡	SZ 斯威士兰
BF 布基纳法索	GE 格鲁吉亚	LV 拉托维亚	TD 乍得
BG 保加利亚	CH 加纳	MA 摩洛哥	TG 多哥
BJ 贝宁	GM 冈比亚	MC 摩纳哥	TJ 塔吉克斯坦
BR 巴西	GN 几内亚	MD 摩尔多瓦共和国	TM 土库曼斯坦
BY 白俄罗斯	GR 希腊	MG 马达加斯加	TR 土耳其
CA 加拿大	GW 几内亚比绍	MK 前南斯拉夫马其顿共和国	TT 特立尼达和多巴哥
CF 中非共和国	HR 克罗地亚	ML 马里	TZ 坦桑尼亚
CG 刚果	HU 匈牙利	MN 蒙古	UA 乌克兰
CH 瑞士	ID 印度尼西亚	MR 毛里塔尼亚	UG 乌干达
CI 科特迪瓦	IE 爱尔兰	MW 马拉维	US 美国
CM 喀麦隆	IL 以色列	MX 墨西哥	UZ 乌兹别克斯坦
CN 中国	IN 印度	NE 尼日尔	VN 越南
CR 哥斯达黎加	IS 冰岛	NL 荷兰	YU 南斯拉夫
CU 古巴	IT 意大利	NO 挪威	ZA 南非
CY 塞浦路斯	JP 日本	NZ 新西兰	ZW 津巴布韦
CZ 捷克共和国	KE 肯尼亚	PL 波兰	
DE 德国	KG 吉尔吉斯斯坦	PT 葡萄牙	

一种新的人溶菌酶基因、其编码的多肽及制备方法

发明领域

5 本发明涉及一种新的多核苷酸，由该多核苷酸编码的多肽，这些多核苷酸和多肽的应用，以及所述多核苷酸和所述多肽的生产方法。更具体地说，本发明的多肽涉及溶菌酶家族的一个新成员。

背景技术

10 溶菌酶广泛存在于生物体的各个部分中，包括各种组织、器官和血清，鸡蛋清中的含量尤为丰富，它主要由特定的腺体上皮细胞或是某些白细胞分泌产生。

溶菌酶最早见诸报导是在1922年由Fleming等发表的论文。自那以后，溶菌酶被从各个不同的角度进行了广泛的研究，例如它晶体结构、蛋白催化结构域、催化动力学、免疫学、分子进化学等方面已发表了大量的文献。溶菌酶已成为研究最广泛、最深入的蛋白质之一。但是，关于溶菌酶基因的研究还开展的很不够。
15 迄今为止只有少数物种的溶菌酶基因已被克隆：如大肠杆菌T4溶菌酶、沙门氏菌P22噬菌体溶菌酶、杆菌 ϕ 噬菌体溶菌酶、鸡溶菌酶等等(1983 J. Mol. Biol. 165, 229-248; 1985 Virology 143,280-289.; 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 955-958.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5759-5763)。人中有关溶菌酶基因克隆方面的报道也已有相关文献公布(1988 Gene 66, 223-234.)。

20 溶菌酶的主要作用通过裂解细菌细胞壁的NAM(N-乙酰胞壁酸)和NAG(N-乙酰葡萄糖酸)间的 β (1-4)糖苷键而达到裂解细胞的效果。生物体中溶菌酶作为一种非特异性的免疫分子具有抗细菌感染作用，在肠道内及一些依靠细菌生存的软体动物中还被作为一种消化酶起作用。溶菌酶还有抑制肿瘤生长的功能。正是由于溶菌酶具有上述功能，所以它无论在工业上还是在医学上都有重要的应用价值。

25

发明概述

本发明的一个目的是提供一种新的多核苷酸，该多核苷酸编码溶菌酶基因家族的一个新成员，本发明新的人溶菌酶被命名为LYC2。

30 本发明的另一个目的是提供一种新的溶菌酶蛋白家族成员，该酶被命名为LYC2。

本发明的再一个目的是提供一种利用重组技术生产所述的新的溶菌酶的方法。

本发明还涉及这种人溶菌酶的应用。

在本发明的一个方面，提供了一种分离出的DNA分子，它包括：编码具有人LYC2蛋白活性的多肽的核苷酸序列，所述的核苷酸序列与SEQ ID NO: 3中从核苷酸106-552位的核苷酸序列有至少70%的同源性；或者所述的核苷酸序列能在中度严紧条件下与SEQ ID NO: 3中从核苷酸106-552位的核苷酸序列杂交。较佳地，所述的序列编码一多肽，该多肽具有SEQ ID NO: 4所示的序列或SEQ ID NO: 4中20 - 148位氨基酸序列。更佳地，该序列具有SEQ ID NO: 3中从核苷酸106-552位的核苷酸序列。

在本发明的另一方面，提供了一种分离的LYC2蛋白多肽，它包括：具有SEQ ID NO: 4氨基酸序列或SEQ ID NO: 4中20 - 148位氨基酸序列的多肽、或其活性片段，或其活性衍生物。较佳地，该多肽是具有SEQ ID NO: 4序列或SEQ ID NO: 4中20 - 148位氨基酸序列的多肽。

在本发明的另一方面，提供了一种载体，它含有上述分离出的DNA。

在本发明的另一方面，提供了一种所述载体转化的宿主细胞。

在本发明的另一方面，提供了一种产生具有LYC2蛋白活性的多肽的方法，该方法包括：

(a)将编码具有LYC2蛋白活性的多肽的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列，形成LYC2蛋白表达载体，所述的核苷酸序列与SEQ ID NO: 3中从核苷酸106-552位的核苷酸序列有至少70%的同源性；

(b)将步骤(a)中的表达载体转入宿主细胞，形成LYC2蛋白的重组细胞；

(c)在适合表达LYC2蛋白多肽的条件下，培养步骤(b)中的重组细胞；

(d)分离出具有LYC2蛋白活性的多肽。

在本发明的一个具体实施方案中，本发明的分离的多核苷酸全长为583个核苷酸，其详细序列见SEQ ID NO: 3，其中开放读框位于106-552位核苷酸。

在本发明中，“分离的”、“纯化的”或“基本纯的”DNA是指，该DNA或片段已从天然状态下位于其两侧的序列中分离出来，还指该DNA或片段已经与天然状态下伴随核酸的组份分开，而且已经与在细胞中伴随其的蛋白质分开。

在本发明中，术语“LYC2蛋白(或多肽)编码序列”指编码具有LYC2蛋白活性的多肽的核苷酸序列，如SEQ ID NO: 3中106-552位核苷酸序列及其简并序列。该简并序列是指，位于SEQ ID NO: 3序列的编码框106-552位核苷酸中，有一个或多个密码子被编码相同氨基酸的简并密码子所取代后而产生的序列。由于密码子

的简并性，所以与SEQ ID NO: 3中106-552位核苷酸序列同源性低至约70%的简并序列也能编码出SEQ ID NO: 4所述的序列。该术语还包括能在中度严紧条件下与SEQ ID NO: 3中从核苷酸106-552位的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。此外，该术语还包括与SEQ ID NO: 3中从核苷酸106-552位的核苷酸序列的同源性至少70%
5 %，更佳地至少80%，更佳地至少90%的核苷酸序列。此外，该术语还包括了仅编码去除了信号肽后的成熟蛋白的核苷酸序列，如SEQ ID NO: 3中从163 - 552位的核苷酸序列。

该术语还包括能编码具有与人LYC2相同功能的蛋白的、SEQ ID NO: 3序列的变异形式。这些变异形式包括(但不限于): 若干个(通常为1 - 90个，更佳地1
10 - 60个，更佳地1 - 20个，最佳地1 - 10个)核苷酸的缺失、插入和/或取代，以及在5'和/或3'端添加数个(通常为60个以内，更佳地为30个以内，更佳地为10个以内，最佳地为5个以内)核苷酸。

在本发明中，“基本纯的”蛋白质或多肽是指其至少占样品总物质的至少20%，更佳地至少50%，更佳地至少80%，最佳地至少90%(按干重或湿重计)。纯度可以用任何合适的方法进行测量，如用柱层析、PAGE或HPLC法测量多肽的纯度。
15 基本纯的多肽基本上不含天然状态下的伴随其的组分。

在本发明中，术语“LYC2蛋白多肽”指具有LYC2蛋白活性的SEQ ID NO: 4序列或SEQ ID NO: 4中20 - 148位氨基酸序列的多肽。该术语还包括具有与人溶菌酶相同功能的、SEQ ID NO: 4序列或SEQ ID NO: 4中20 - 148位氨基酸序列的变异形式。这些变异形式包括(但不限于): 若干个(通常为1 - 50个，更佳地1 - 30
20 个，更佳地1 - 20个，最佳地1 - 10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代，以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内，更佳地为10个以内，更佳地为5个以内)氨基酸。例如，在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸进行取代时，通常不会改变蛋白质的功能。又比如，在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括LYC2蛋白的活性片段和活性衍
25 生物。

该多肽的变异形式包括: 同源序列、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严谨度条件下能与LYC2 DNA 杂交的DNA所编码的蛋白、以及利用抗LYC2多肽的抗血清获得的多肽或蛋白。本发明还提供了其他多肽，如包含LYC2
30 多肽或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外，本发明还提供了LYC2多肽的可溶性片段。通常，该片段具有LYC2多肽序列的至少约10个连续氨基酸，通常至少约30个连续氨基酸，更佳地至少约50个连续氨基酸，更佳地至少约80个连

续氨基酸，最佳地至少约100个连续氨基酸。

发明还提供LYC2蛋白或多肽的类似物。这些类似物与天然LYC2多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异，也可以是不影响序列的修饰形式上的差异，或者兼而有之。这些多肽包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到，如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变，还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还可以包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如D-氨基酸)的类似物，以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 β 、 γ -氨基酸)的类似物。应理解，本发明的多肽并不限于上述例举的代表性的多肽。

修饰(通常不改变一级结构)形式包括：体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化，如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸，磷酸丝氨酸，磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

本发明还包括LYC2多肽编码序列的反义序列。这种反义序列可用于抑制细胞内LYC2的表达。

本发明还包括一种探针分子，该分子通常具有LYC2多肽编码序列的8-100个，较佳地15-50个连续核苷酸。该探针可用于检测样品中是否存在编码LYC2的核酸分子。

本发明还包括检测LYC2核苷酸序列的方法，它包括用上述的探针与样品进行杂交，然后检测探针是否发生了结合。较佳地，该样品是PCR扩增后的产物，其中PCR扩增引物对应于LYC2多肽的编码序列，可位于该编码序列的两侧或中间。引物长度一般为20-50个核苷酸。

在本发明中，可选用本领域已知的各种载体，如市售的载体。

在本发明中，术语“宿主细胞”包括原核细胞和真核细胞。常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌等。常用的真核宿主细胞包括酵母细胞，昆虫细胞、和哺乳动物细胞。较佳地，该宿主细胞是真核细胞，如CHO细胞、COS细胞等。

另一方面，本发明还包括对LYC2 DNA或是其片段编码的多肽具有特异性抗体，尤其是单克隆抗体。这里，“特异性”是指抗体能结合于LYC2基因产物或片段。较佳地，指那些能与LYC2基因产物或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明中抗体包括那些能够结合并抑制LYC2蛋白的分

子, 也包括那些并不影响LYC2蛋白功能的抗体。本发明还包括那些能与修饰或未经修饰形式的LYC2基因产物结合的抗体。

本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体, 而且还包括具有免疫活性的抗体片段, 如Fab'或(Fab)₂片段; 抗体重链; 抗体轻链; 遗传工程改造的单链Fv分子 (Ladner等人, 美国专利No. 4,946,778); 或嵌合抗体, 如具有鼠抗体结合特异性但仍保留来自人的抗体部分的抗体。

本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如, 纯化的LYC2基因产物或者其具有抗原性的片段, 可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的, 表达LYC2或其具有抗原性的片段的细胞可用来免疫动物来生产抗体。本发明的抗体也可以是单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备(见 Kohler 等人, Nature 256:495, 1975; Kohler 等人, Eur.J.Immunol. 6:511, 1976; Kohler 等人, Eur.J.Immunol. 6:292, 1976; Hammerling 等人, In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., 1981)。本发明的抗体包括能阻断LYC2功能的抗体以及不影响LYC2功能的抗体。本发明的各类抗体可以利用LYC2基因产物的片段或功能区, 通过免疫技术获得。这些片段或功能区可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。与LYC2基因产物的未修饰形式结合的抗体可以用原核细胞(例如*E. Coli*)中生产的基因产物来免疫动物而产生; 与翻译后修饰形式结合的抗体(如糖基化或磷酸化的蛋白或多肽), 可以用真核细胞(例如酵母或昆虫细胞)中产生的基因产物来免疫动物而获得。

本发明的人LYC2核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法, 可根据本发明所公开的有关核苷酸序列, 尤其是开放阅读框序列来设计引物, 并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板, 扩增而得有关序列。当序列较长时, 常常需要进行两次或多次PCR扩增, 然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列, 就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体, 再转入细胞, 然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

除了用重组法产生之外, 本发明蛋白的片段还可用固相技术, 通过直接合成肽而加以生产(Stewart 等人, (1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co., San Francisco; Merrifield J. (1963) J. Am Chem. Soc 85: 2149-2154)。在体外合成蛋白质可以用手工或自动进行。例如, 可以用 Applied Biosystems 的 431A 型肽

合成仪(Foster City, CA)来自动合成肽。可以分别化学合成本发明蛋白的各片段,然后用化学方法加以连接以产生全长的分子。

本发明蛋白的编码序列还可用于基因定位。例如,通过荧光原位杂交技术(FISH),将 cDNA 克隆与分裂中期的染色体进行杂交,可以准确地进行染色体定位。该技术可以使用短至约 500bp 的 cDNA;也可以使用长至约 2000bp 或者更长的 cDNA。对于该技术,可参见 Verma 等人,Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York(1988)。

一旦序列被定位于染色体上的某个精确位置,将可以将序列在染色体上的物理位置与遗传图谱数据相关联。这些遗传图谱数据是可以获得的,例如通过孟德尔(Mendelian)人遗传数据库(可通过 Johns Hopkins University Welch Medical Library 在网上获得)。然后,通过连锁分析来鉴定基因与已定位于同一染色体区域的疾病之间的相关性。

接着,有必要确定患病个体和健康个体之间的 cDNA 或基因组序列方面的差异。如果某一突变存在于部分或全部患病个体但不存在于正常个体,那么该突变可能就是该疾病的致病因素。

利用本发明蛋白,通过各种常规筛选方法,可筛选出与 LYC2 发生相互作用的物质,如受体、抑制剂或拮抗剂等。

本发明蛋白及其抗体、抑制剂、拮抗剂或受体等,当在治疗上进行施用(给药)时,可提供不同的效果。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中 pH 通常为约 5 - 8,较佳地 pH 约为 6 - 8,尽管 pH 值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但不限于):肌内、腹膜内、皮下、皮内、或局部给药。

以本发明的人 LYC2 蛋白为例,可以将其与合适的药学上可接受的载体联用。这类药物组合物含有治疗有效量的蛋白质和药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的人 LYC2 蛋白可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物,可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约 1 微克/千克体重 - 约 5 毫克/千克体重。此外,本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

当本发明的人LYC2蛋白多肽被用作药物时，可将治疗有效剂量的该多肽施用于哺乳动物，其中该治疗有效剂量通常至少约10微克/千克体重，而且在大多数情况下不超过约8毫克/千克体重，较佳地该剂量是约10微克/千克体重 - 约1毫克/千克体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围之内的。

在本发明的一个实施方案中，本发明的多核苷酸全长为610个核苷酸，其详细序列见SEQ ID NO: 3，其中开放读框位于106-252位核苷酸。该多核苷酸是如此获得的，以人脑 λ gt11cDNA文库(购自Clontech公司)为模板，合成正向引物A1: 5'-ACTAGGTGTATCAGTGTTCCTTC -3' 和 反向引物 B1: 5'-GGACATTCACTGCAAATCCTAGG-3'进行PCR，获得610bp的目的片段。测序后得到SEQ ID NO: 3的全长cDNA序列。

根据同源比较的结果，本发明的核苷酸序列及其编码的蛋白质序列与不同来源的溶菌酶显示了显著的同源性，因此，这表明它是溶菌酶家族的一个新成员，并且具有溶菌酶家族蛋白的一些重要功能。

溶菌酶可以通过裂解细菌细胞壁的NAM(N-乙酰胞壁酸)和NAG(N-乙酰葡萄糖酸)间的 β (1-4)糖苷键而达到裂解细胞的效果。生物体中溶菌酶作为一种非特异性的免疫分子具有抗细菌感染作用，在肠道内及一些依靠细菌生存的软体动物中还被作为一种消化酶起作用。溶菌酶还有抑制肿瘤生长的功能。1955年，Caselli 和 Shumacher(1955 Boll Ocul 34:513-533.)就报导了在由劳氏肉瘤病毒引起的鸡的角膜肿瘤形成中，溶菌酶介导了对这一过程的70%的抑制作用。许多其它的实验也说明溶菌酶参与了肿瘤的扩散及与肿瘤细胞的磷酸基和糖脂类分子的相互作用。溶菌酶对人类肿瘤的抑制作用也已见诸报导并取得专利(1980 Jpn Kokai Tokkyo Koho 33, 409.; 1980 Jpn Kokai Tokkyo Koho 33, 408)。至于溶菌酶对肿瘤抑制的机制，有两种可能性，一是溶菌酶直接活化了生物体的免疫功能，二是它间接增强了生物的免疫能力(1989 Anticancer Reserch 9,583-592)。

附图简述

图1为本发明的人LYC2与其他溶菌酶的蛋白比较图。其中图1A是人LYC2与 ring-necked pheasant 的溶菌酶C(sp|p00702)的氨基酸序列的同源比较图；图1B是人LYC2与 red guenon 的溶菌酶C(sp|P30200)的氨基酸序列的同源比较图。相同的氨基酸在两个序列之间用“:”标出，相似的氨基酸用“.”标出。相似的氨基酸是：A,S,T; D,E; N,Q; R,K; I,L,M,V; F,Y,W。

图2显示了本发明LYC2对肿瘤细胞的溶胞作用。图2A显示了用pcDNA3 - LYC2转染CHO后的细胞上清液处理24小时后的鼻咽癌细胞。图2B显示了用pcDNA3载体空载体转染CHO后的细胞上清液处理24小时的鼻咽癌细胞。

5 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如Sambrook等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

10 实施例

实施例1

LYC2的cDNA序列的克隆和测定

1. 引物扩增

15 以人脑 λ gt11cDNA文库(购自Clontech公司)为模板，用一对寡核苷酸为引物——A1: 5'- ACTAGGTGTATCAGTGTTC -3' (SEQ ID NO: 1)为正向引物，寡核苷酸B1: 5'- GGACATTCAGTCAAATCCTAGG-3'(SEQ ID NO: 2)为反向引物，进行PCR。PCR条件为93℃ 4分钟，随之以93℃ 1分钟、64℃ 1分钟和72℃ 1分钟进行35个循环，最后72℃ 延伸5分钟。电泳检测得到的PCR片断为610bp的目的片段。

20

2. PCR产物的测序

25 将如上获得的PCR扩增产物与pGEM-T®载体(Promega)连接，转化大肠杆菌JM103，用QIAprep Plasmid试剂盒(QIAGEN)提取质粒，用双链嵌套式缺失试剂盒(PHarmacia)对插入片段进行定向系列缺失，然后用PCR对缺失子进行快速鉴定及排序。用SequiTherm EXCEL™ DNA测序试剂盒(Epicentre Technologies)对依次截短的缺失子进行测序，最后用电脑软件拼接顺序，获得全长cDNA序列，共610bp，详细序列见SEQ ID NO: 3，其中开放读框位于106-552位核苷酸。

根据得到的全长cDNA序列推导出LYC2的氨基酸序列，共148个氨基酸残基，其氨基酸序列详见SEQ ID NO: 4。

30

实施例2

同源比较

用LYC2的全长cDNA序列及其编码蛋白在Non-redundant GenBank+EMBL+DDBJ+PDB数据库及Non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+Spupdate+PIR数据库中用BLAST进行核酸和蛋白同源检索。结果发现它们溶菌酶家族成员显示了较高的同源性，如用PCGENE软件
5 分析，它与ring-necked pheasant的溶菌酶C(sp|p00702)在蛋白水平上显示了47.6%的同一性和64%的相似性(图1A)；又如，它与red guenon的溶菌酶C(sp|P30200)在蛋白水平上显示了45.3%的同一性和60%的相似性(图1B)。

特别是在LYC2的氨基酸序列中存在由19个氨基酸组成的被认为是溶菌酶和 α 乳清蛋白的特征性序列——CX₃CX₂(L/M/F)X₃(D/E/N)(L/I)X₅C[注：该序列中X
10 为任意氨基酸，“2”等数字为氨基酸数目，“(L/M/H)”表示从这3个氨基酸中任选一个氨基酸](溶菌酶和 α 乳清蛋白是在进化上密切相关的两类蛋白(Eur.J.Biochem. 182:111-118))。在本发明的蛋白中符合上述模式的序列片段是：CHVAC₃SALITDDLTDALIC(SEQ ID NO: 4中94-112位)。所以这更确定了本发明的LYC2也属于溶菌酶家族，并且具有溶菌酶家族的相关功能。

15 本发明的人LYC2蛋白有19个氨基酸的信号肽(即SEQ ID NO: 4中1-19位)，去除了信号肽后的成熟人LYC2蛋白具有SEQ ID NO: 4中20-148位的氨基酸序列。

溶菌酶可以通过裂解细菌细胞壁的NAM(N-乙酰胞壁酸)和NAG(N-乙酰葡萄糖酸)间的 β (1-4)糖苷键而达到裂解细胞的效果。生物体中溶菌酶作为一种非特异
20 性的免疫分子具有抗细菌感染作用，在肠道内及一些依靠细菌生存的软体动物中还被作为一种消化酶起作用。

溶菌酶无论在工业上还是在医学上都有重要的用途。

首先在工业上(主要是食品工业)，溶菌酶可以作为食品的保鲜剂或添加剂使用。在这方面，日本人已做了大量应用并拥有许多专利。比如他们已将溶菌酶用
25 作新鲜水果蔬菜、豆奶、海洋食品和肉类，葡萄酒等的保鲜剂。溶菌酶还可以用作婴儿食品的添加剂以使其更接近人乳的成份(1988 Crit Rev Food Sci Nutr 26(4):359-395)。

药用方面，溶菌酶可以用来治疗病毒和细菌感染。如EDTA-tris-溶菌酶溶液对于治疗大肠菌感染引起的假单胞菌属膀胱炎有效。人和动物血清中溶菌酶的水
30 平可以作为是否受到感染的一种标志。Zajackowska-Bialowas、Murai等研究了唾液溶菌酶活性和口腔疾病间的关系。他们的研究显示，溶菌酶对慢性牙周炎的症状具有明显的缓解作用。另外，还发现溶菌酶与某些抗生素具有协同作用，例如

溶菌酶在单独使用的时候, 即使用量较大对S.aureus的溶菌作用也很小, 但在阿莫西林存在的情况下其溶菌作用增强并与溶菌酶的量成正比(1988 Crit Rev Food Sci Nutr 26(4):359-395).

溶菌酶还有抑制肿瘤生长的功能. 1955年, Caselli 和Shumacher(1955 Boll Ocul 34:513-533.)就报导了在由劳氏肉瘤病毒引起的鸡的角膜肿瘤形成中, 溶菌酶介导了对这一过程的70%的抑制作用. 许多其它的实验也说明溶菌酶与抑制肿瘤的扩散有关(1988 Clin Expl Metastasis 6:245-253; 1998 Folia Oncol 10,suppl A:219-224;1988 Eur J Cancer Clin Oncol24:1737-1743). 溶菌酶还被发现能与肿瘤细胞的磷酸基和糖脂类分子的相互作用(1988 Crit Rev Food Sci Nutr 26(4):359-395). 溶菌酶对人类肿瘤的抑制作用也已见诸报导,Laterza就用溶菌酶成功的治疗了一例手术和放疗后发生转移的小肠网状肉瘤病例(《Atti del II Simposium Internazionale sul Lisozima》, Milano. 7-8-9 1961.Vol I, sez V,pp 49-50); Battaglia等在用溶菌酶治疗胃癌、前列腺癌、子宫癌、乳房癌的探索中发现, 溶菌酶虽不能使肿瘤体积减小, 但具有明显的减轻疼痛和辅助恢复的作用(《Atti del II Simposium Internazionale sul Lisozima di Fleming》, Milano. 3-4-5 1964.Vol I, sez IV,pp 69-76); 在日本, 溶菌酶在治疗癌症方面的应用已取得专利(1980 Jpn Kokai Tokkyo Koho 33, 409.; 1980 Jpn Kokai Tokkyo Koho 33, 408); 另外, A. Vacca.等在1985年报道了在化学免疫疗法中使用口服溶菌酶作为免疫调节剂治疗多种骨髓瘤(multiple myeloma)的尝试, 他们的实验显示在接受大剂量溶菌酶治疗的患者中50%的人免疫能力较之对照组增强了(Chemiother IV n.2:147-155,1985). 至于溶菌酶对肿瘤抑制的机制, 有两种可能性, 一是溶菌酶直接活化了生物体的免疫功能, 二是它间接增强了生物的免疫能力(1989 Anticancer Reserch 9,583-592).

实施例3

LYC2在大肠杆菌中的表达

编码LYC2的cDNA序列用对应于该DNA序列的5'和3'端的PCR寡核苷酸引物, 用人脑 λ gt11cDNA文库(购自Clontech公司)为模板进行扩增, 以合成插入片段.

5'寡核苷酸引物序列为

5'- TTCCGGATCCATGAAGGCTGCGGGCATTTC-3'(SEQ ID NO: 5),

该引物含有BamHI限制性内切酶的酶切位点, 接之是由起始密码子开始的LYC2编码序列的19个核苷酸;

3 寡核苷酸引物序列为

5 - CTTTCGTCGACTTAGGAAACCTCACAGCCT-3 (SEQ ID NO: 6),

该引物含有SalI限制性内切酶的酶切位点, 一个翻译终止子和LYC2的编码序列。

- 5 限制性内切酶的酶切位点对应于细菌表达载体pQE-9(Qiagen Inc., Chatsworth, CA)上的限制性内切酶酶切位点, 该质粒载体编码抗生素抗性(Amp^r)、一个细菌复制起点(ori)、一个IPTG-可调启动子/操纵子(P/O)、一个核糖体结合位点(RBS)、一个6-组氨酸标记物(6-His)以及限制性内切酶克隆位点。

- 10 用BamHI和SalI消化pQE-9载体, 随后将插入片段连接到pQE-9载体并保持开放读框在细菌RBS起始。随后用连接混合物转化购自Qiagen, 商品名为M15/rep4的E.coli菌株, M15/rep4含有多拷贝的质粒pREP4, 其表达lacI阻遏物并携带卡那霉素抗性(Kan^r)。在含有Amp和Kan的LB培养皿上筛选转化子, 在补加Amp(100 μ g/ml)和Kan(25 μ g/ml)的LB液体培养基中过夜培养(O/N)含所需构建物的阳性转化子克隆。抽提质粒, 用HindIII酶切鉴定插入片段大小及方向, 测序验证结果
- 15 表明LYC2的cDNA插入片段已正确装入载体。

- 过夜(O/N)培养物以1: 100-1: 250的稀释率稀释, 然后接种到大体积培养基中, 培养细胞生长至600光密度(OD₆₀₀)为0.4-0.6时, 加入IPTG(“异丙基硫代- β -D-半乳糖苷”)至终浓度为1mM。通过使lacI阻遏物失活, IPTG诱导启动P/O导致基因表达水平提高。继续培养细胞3-4小时, 随后离心(6000 \times g, 20分钟)。超声
- 20 裂解培养物, 收集细胞裂解液并将其稀释于6M的盐酸胍中。澄清后, 通过在能使含6-His标记物蛋白紧密结合的条件下, 用镍-螯合柱层析从溶液中纯化溶解的LYC2。用6M盐酸胍(pH5.0)从柱中洗脱LYC2。可用几种方法从盐酸胍中变性沉淀蛋白。首先, 使用透析步骤除去盐酸胍, 或者从镍-螯合柱中分离出的纯化蛋白可以结合到第二个柱中, 该柱中具有递减的线性盐酸胍梯度。在结合到该柱时蛋
- 25 白质变性, 随后用盐酸胍(pH5.0)洗脱。最后, 将可溶的蛋白质用PBS进行透析, 然后将蛋白质保存在终浓度为10%(w/v)甘油的贮存液中。

用12%的SDS-PAGE胶进行电泳, 鉴定表达蛋白的分子量大小为17KDa。

此外, 用常规方法对表达蛋白的N端和C端各10个氨基酸长度的氨基酸进行测序, 发现与SEQ ID NO: 4的序列一致。

30

实施例4

LYC2在真核细胞(CHO细胞株)中的表达

在该实施例中, 将编码LYC2的cDNA序列用对应于该DNA序列的5'和3'端的PCR寡核苷酸引物, 用人脑 λ gt11cDNA文库(购自Clontech公司)为模板进行扩增, 以合成插入片段。

PCR反应中使用的5'寡核苷酸引物序列为:

5 5'-TTCCAAGCTTATGAAGGCTGCGGGCATTC- 3'(SEQ ID NO: 7),

该引物含有HindIII限制性内切酶的酶切位点, 接之是由起始密码子开始的LYC2编码序列的19个核苷酸;

3'端引物序列为:

10 5 -CTTCGGATCCTTAGGAAACCTCACAGCCT- 3 (SEQ ID NO: 8)

该引物含有BamHI限制性内切酶的酶切位点、一个翻译终止子和LYC2的编码序列。

引物上的限制性内切酶的酶切位点对应于CHO细胞表达载体pcDNA3上的限制性内切酶酶切位点, 该质粒载体编码抗生素抗性(Amp^r和Neo^r)、一个噬菌体复制起点(f1 ori)、一个病毒复制起点(SV40 ori)、一个T7启动子、一个病毒启动子(P-CMV)、一个Sp6启动子、一个SV40启动子、一个SV40加尾信号和相应的polyA
15 顺序、一个BGH加尾信号和相应的polyA顺序。

用HindIII、BamHI消化pcDNA3载体, 随后将插入片段连接到pcDNA3载体。随后用连接混合物转化E.coli DH5 α 菌株。在含有Amp的LB培养皿上筛选转化子, 在补加Amp(100 μ g/ml)的LB液体培养基中过夜培养(O/N)含所需构建物的克隆。
20 抽提质粒, 测序验证结果表明LYC2的cDNA插入片段已正确装入载体。

质粒转染是采用脂转染法, 用Lipofectin试剂盒(GiBco Life)进行的。转染48小时后, 经2-3周的持续G418加压筛选, 收集细胞及细胞上清测定表达蛋白酶活力。去G418, 连续传代培养; 对混合克隆细胞极限稀释, 选择具有较高蛋白活性的细胞亚克隆。按常规方法大量培养上述阳性亚克隆。48小时后, 开始收集细胞
25 及上清, 用超声裂解方法破碎细胞。以含0.05% Triton的50mM Tris \cdot HCl(pH7.6)溶液为平衡液及洗脱液, 用经预平衡的Superdex G-75柱收集上述蛋白的活性峰。再用50mM Tris \cdot HCl(pH8.0)平衡的DEAE-Sepharose柱, 以含0-1M NaCl的50mM Tris \cdot HCl(pH8.0)溶液为洗脱液进行梯度洗脱, 收集上述蛋白的活性峰。然后以PBS(pH7.4)为透析液对表达蛋白溶液进行透析。最后冻干保存。

30 用12%的SDS-PAGE胶进行电泳, 鉴定表达蛋白的分子量大小为15KDa。

同时, 还设计了去除信号肽的5'寡核苷酸引物: 5'-TTCCAAGCTTAAAATCTACA CTCGTTGC-3'(SEQ ID NO: 9)。以SEQ ID NO: 9和8为引物, 重复

上述的实施例4步骤，同样获得了分子量为15kDa的表达蛋白，即去除了信号肽的LYC2蛋白。

此外，用常规方法对表达蛋白的N端和C端各10个氨基酸长度的氨基酸进行测序，发现与SEQ ID NO: 4的序列一致。

5

实施例5

制备抗体

将如上获得的重组蛋白用来免疫动物以产生抗体，具体如下。重组分子用层析法进行分离后备用。也可用SDS-PAGE凝胶电泳法进行分离，将电泳条带从凝胶中切下，并用等体积的完全Freund s佐剂乳化。用50-100 μ g/0.2ml乳化过的蛋白，对小鼠进行腹膜内注射。14天后，用非完全Freund s佐剂乳化的同样抗原对小鼠以50-100 μ g/0.2ml的剂量进行腹膜内注射以加强免疫。每隔14天进行一次加强免疫，至少进行三次。获得的抗血清的特异反应活性用它在体外沉淀LYC2基因翻译产物的能力加以评估。

15

实施例6

LYC2的杀肿瘤细胞作用

如实施例4，将LYC2基因转染CHO细胞后，细胞生长迅速减慢。取该细胞培养3天后的上清液分别加入到数种肿瘤细胞的培养液中。24小时后，观察肿瘤细胞的生长情况。参见图2A和2B，图2A显示了用LYC2处理24小时后的鼻咽癌细胞，癌细胞发生破裂和溶胞现象。图2B用pcDNA3载体空载体转染CHO后的细胞上清液处理24小时的鼻咽癌细胞，未发现癌细胞破裂现象。结果还发现，LYC2可以使膀胱癌细胞、鼻咽癌细胞、肺腺癌细胞和多核巨细胞性白细胞细胞发生破裂，而对肝癌细胞、肺小细胞癌细胞和T淋巴细胞性白细胞细胞的生长没有干扰作用。这表明LYC2具有组织选择性杀伤肿瘤细胞的能力。

25

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

30

序列表

(2)SEQ ID NO: 1的信息

(i)序列特征

- 5 (A)长度: 23碱基
(B)类型: 核酸
(C)链性: 单链
(D)拓扑: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

- 10 (xi)序列描述: SEQ ID NO: 1:

ACTAGGTGTA TCAGTGTTTC TTC 23

(2)SEQ ID NO: 2的信息

(i)序列特征

- 15 (A)长度: 23碱基
(B)类型: 核酸
(C)链性: 单链
(D)拓扑: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

- 20 (xi)序列描述: SEQ ID NO : 2

GGACATTAC TGCAAATCCT AGG 23

(2)SEQ ID NO: 3的信息:

(i)序列特征:

- 25 (A)长度: 610bp
(B)类型: 核酸
(C)链性: 双链
(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: cDNA

- 30 (xi)序列描述: SEQ ID NO: 3

1 ACTAGGTGGA GCAGTGTTTC TTCCGCAGAC TCAACTGAGA AGTCAGCCTC TGGGGCAGGC
61 ACCAGGAATC TGCCTTTTNA GTTCTGTNTC CGGCAGGCTT TGAGGATGAA GGCTGCGGGC

121 ATTCTGACCC TCATTGGCTG CCTGGTCACA GGCGCCGAGT CCAAAATCTA CACTCGTTGC
181 AAAGTGGCAA AAATATTCTC GAGGGCTGGC CTGGACAATT ACTGGGGCTT CAGCCTTGGA
241 AACTGGATCT GCATGGCATA TTATGAGAGC GGCTACAACA CCACAGCCCA GACGGTCCTG
301 GATGACGGCA GCATCGACTA CGGCATCTTC CAGATCAACA CGTTCGCGTG GTGCAGACGC
5 361 GGAAAGCTGA AGGAGAACAA CCACTGCCAC GTCGCCTGCT CAGCCTTGAT CACTGATGAC
421 CTCACAGATG CAATTATCTG TGCCAGGAAA ATTGTAAAG AGACACAAGG AATGAACTAT
481 TGGCAAGGCT GGAAGAAACA TTGTGAGGGC AGAGACCTGT CCGAGTGGAA AAAAGGCTGT
541 GAGGTTTCCT AAAGTGAAC TGGACCCAGG ATGCTTTGCA GCAACGCCCT AGGATTTGCA
601 GTGAATGTCC

10

(2)SEQ ID NO: 4的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 148个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

15

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 多肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 4

20

25

1 Met Lys Ala Ala Gly Ile Leu Thr Leu Ile Gly•Cys Leu Val Thr
16 Gly Ala Glu Ser Lys Ile Tyr Thr Arg Cys Lys Leu Ala Lys Ile
31 Phe Ser Arg Ala Gly Leu Asp Asn Tyr Trp Gly Phe Ser Leu Gly
46 Asn Trp Ile Cys Met Ala Tyr Tyr Glu Ser Gly Tyr Asn Thr Thr
61 Ala Gln Thr Val Leu Asp Asp Gly Ser Ile Asp Tyr Gly Ile Phe
76 Gln Ile Asn Thr Phe Ala Trp Cys Arg Arg Gly Lys Leu Lys Glu
91 Asn Asn His Cys His Val Ala Cys Ser Ala Leu Ile Thr Asp Asp
106 Leu Thr Asp Ala Ile Ile Cys Ala Arg Lys Ile Val Lys Glu Thr
121 Gln Gly Met Asn Tyr Trp Gln Gly Trp Lys Lys His Cys Glu Gly
136 Arg Asp Leu Ser Glu Trp Lys Lys Gly Cys Glu Val Ser

(2)SEQ ID NO: 5的信息

30

(i)序列特征

(A)长度: 29碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 5:

5 TTCCGGATCC ATGAAGGCTG CGGGCATTC 29

(2)SEQ ID NO: 6的信息

(i)序列特征

(A)长度: 29碱基

10 (B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 6:

15 CTTCGTCGAC TTAGGAAACC TCACAGCCT 29

(2)SEQ ID NO: 7的信息

(i)序列特征

(A)长度: 29碱基

20 (B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 7:

25 TTCCAAGCTT ATGAAGGCTG CGGGCATTC 29

(2)SEQ ID NO: 8的信息

(i)序列特征

(A)长度: 29碱基

30 (B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 8:

CTTCGGATCC TTAGGAAACC TCACAGCCT

29

5 (2)SEQ ID NO: 9的信息

(i)序列特征

(A)长度: 28碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

10 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 9:

TTCCAAGCTT AAAATCTACA CTCGTTGC

28

权 利 要 求 书

1. 一种分离出的DNA分子, 其特征在于, 它包括: 编码具有人LYC2蛋白活性的多肽的核苷酸序列,
 - 5 所述的核苷酸序列与SEQ ID NO: 3中从核苷酸106-552位的核苷酸序列有至少70%的同源性; 或者
 - 所述的核苷酸序列能在中度严谨条件下与SEQ ID NO: 3中从核苷酸106-552位的核苷酸序列杂交.
2. 如权利要求1所述的DNA分子, 其特征在于, 所述的序列编码一多肽, 该多肽具有SEQ ID NO: 4所示的序列或SEQ ID NO: 4中20 - 148位氨基酸序列.
3. 如权利要求1所述的DNA分子, 其特征在于, 该序列具有SEQ ID NO: 3中从核苷酸106-552位的核苷酸序列.
4. 一种分离的LYC2蛋白多肽, 其特征在于, 它包括: 具有SEQ ID NO: 4氨基酸序列或SEQ ID NO: 4中20 - 148位氨基酸序列的多肽、或其活性片段, 或其活性衍生物.
 - 15 5. 如权利要求4所述的多肽, 其特征在于, 该多肽是具有SEQ ID NO: 4序列的多肽或SEQ ID NO: 4中20 - 148位氨基酸序列.
 6. 一种载体, 其特征在于, 它含有权利要求1所述的DNA.
 7. 一种用权利要求6所述载体转化的宿主细胞.
 8. 如权利要求7所述的宿主细胞, 其特征在于, 该细胞是大肠杆菌.
 9. 如权利要求7所述的宿主细胞, 其特征在于, 该细胞是真核细胞.
 10. 一种产生具有LYC2蛋白活性的多肽的方法, 其特征在于, 该方法包括:
 - (a) 将编码具有LYC2蛋白活性的多肽的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列, 形成LYC2蛋白表达载体, 所述的核苷酸序列与SEQ ID NO: 3中从核苷酸106-552位的核苷酸序列有至少70%的同源性;
 - (b) 将步骤(a)中的表达载体转入宿主细胞, 形成LYC2蛋白的重组细胞;
 - (c) 在适合表达LYC2蛋白多肽的条件下, 培养步骤(b)中的重组细胞;
 - (d) 分离出具有LYC2蛋白活性的多肽.
 11. 如权利要求10所述的方法, 其特征在于, 该序列为SEQ ID NO: 3中从核苷酸106-552位.
 12. 一种能与权利要求4所述的LYC2蛋白多肽特异性结合的抗体.
 13. 一种核苷酸分子, 其特征在于, 它是权利要求1所述DNA分子的反义序列.

14.一种探针分子, 其特征在于, 它含有权利要求 1 所述的 DNA 分子中约 8-100 个连续核苷酸.

	10	20	30	40	50
LYC2	MKAAGILTLIGCLVT-GAESKIYTRCKLAKIFSRAGLDNYWGFSLGNWICMAYYESGYNT				
	: : : : :				
sp 00702	MRS--LLILVLCFLPLAAPGKVYGRCELAAMKRMGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNT				
	10	20	30	40	50
	60	70	80	90	100
LYC2	TAQTVLDDGSIDYGIFQINTFAWCRRGKLK-ENNHCHVACSALITDDLTAIICARKIVK				
	: : : : :				
sp 00702	GATNRNTDGSIDYGILQINSRWWCNDGRTPGSKNLCHIPCSALLSSDITASVNCACKIVS				
	60	70	80	90	100
	120	130	140		
LYC2	ETQGMNYWQGKKHCEGRDLSEWKKGCEVS				
 : :				
sp 00702	DGNGMNAWVAWRKHCKGTDVNVWIRGCRL-				
	120	130	140		

图 1A

	10	20	30	40	50	60
LYC2	MKAAGILTLIGCLVTGAESKIYTRCKLAKIFSRAGLDNYWGFSLGNWICMAYYESGYNTT					
	: : : : : :					
sp 00702	MKAVIILGLVLLSVT-VQGKIFERCELARTLKRLGLDGYRGISLANWVCLAKWESGYNTQ					
	10	20	30	40	50	
	70	80	90	100	110	
LYC2	AQTVLD-DGSIDYGIFQINTFAWCRRGKLKEN-NHCHVACSALITDDLTAIICARKIVK					
	: : : : : :					
sp P30200	ATNYNPGDQSDYGIFQINSHYWCNNGKTPGAVNACHISCNALLQDNIADAVTCAKRVVR					
	60	70	80	90	100	110
	120	130	140			
LYC2	ETQGMNYWQGKKHCEGRDLSEWKKGCEVS					
 : :					
sp P30200	DPQGIRAWVAWRNHQNRDVSQYVQCGGV-					
	120	130	140			

图 1B

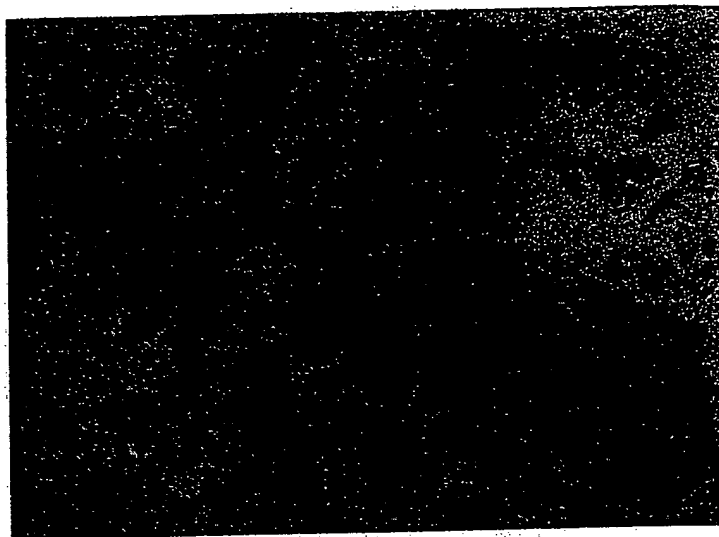


图 2A



图 2B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN99/00131

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶ : C12N15/56, C12N9/36, C07K16/40

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, SwissProt, SPupdate, PIR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
A	J Mol Evol 1991 Feb;32(2):187-98 Dautigny A, et al: " cDNA and amino acid sequences of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) lysozymes and their implications for the evolution of lysozyme and lactalbumin. " see the abstract.	1-14
A	GenBank L36032 03. AUG. 1995 see the sequence. or in: Mol Biol Evol 1994 Nov;11(6):921-928 Kornegay JR, et al: " Molecular adaptation of a leaf-eating bird: stomach lysozyme of the hoatzin. " see the abstract.	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20.SEP.1999 (20.09.99)

Date of mailing of the international search report

30 SEP 1999 (30.09.99)

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office
6, Xitucheng Road, Haidian District,
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-010-62019451

Authorized officer ZENG Fanhui

Telephone No. 86-010-62093723

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN99/00131

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SwissProt P00705 01.JUN.1994 see the sequence. or in: J Biochem (Tokyo) 1982 Feb;91(2):571-587 Kondo K, et al: " Chemical and immunological properties and amino acid sequences of three lysozymes from Peking-duck egg white. " see the abstract.	1-14
A	PIR LZFER 21.JAN.1997 see the sequence. or in: J Biol Chem 1986 Feb 15;261(5):2309-2313 Weisman LS, et al: " Evolutionary shift in the site of cleavage of prelysozyme. " see the abstract.	1-14
A	J Mol Evol 1991 Nov;33(5):418-425 Swanson KW, et al: " Stomach lysozyme gene of the langur monkey: tests for convergence and positive selection. " see the abstract.	1-14
A	Nature 1997 Jan 9;385(6612):151-154 Messier W, Stewart CB: " Episodic adaptive evolution of primate lysozymes. " see the abstract.	1-14

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN99/00131

A. 主题的分类

Int.Cl⁶:C12N15/56,C12N9/36,C07K16/40

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, SwissProt, SPupdate, PIR

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
A	分子进化杂志, 1991 年 2 月; 32(2): 187 - 198 Dautigny A,等: “虹鳟 (Oncorhynchus mykiss) 溶菌酶的 cDNA 和氨基酸序列及其对溶菌酶和乳清蛋白进化的意义。” 见摘要。	1 - 14
A	GenBank L36032 1995 年 8 月 3 日 见序列 或见: 分子生物化学进化, 1994 年 11 月; 11 (6): 921 - 928 。 Kornegay JR 等: “食叶鸟的分子适应: 何爱青鸟的胃溶菌酶。” 见摘要。	1 - 14

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件

“E” 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的

“L” 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

“P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

“T” 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件: 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

“Y” 特别相关的文件: 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

20.09 月 1999(20.09.99)

国际检索报告邮寄日期

30. 9月 1999 (30.09.99)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号:

86-010-62019451

受权官员

曾繁辉

电话号码: 86-01-62098733

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN99/00131

C(续). 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
A	<p>SwissProt P00705 1994 年 6 月 1 日</p> <p>见序列</p> <p>或见: 生化杂志 (东京), 1982 年 2 月; 91(2): 571 — 587</p> <p>Kondo K,等: “北京鸭蛋清三种溶菌酶的化学和免疫学特征以及氨基酸序列。”</p> <p>见摘要。</p>	1 — 14
A	<p>PIR LZFEER 1997 年 1 月 21 日</p> <p>见序列。</p> <p>或见: 生物学化学杂志, 1986 年 2 月 15 日; 261 (5): 2309 — 2313</p> <p>Weisman LS,等: “溶菌酶原裂解位点的进化漂变。”</p> <p>见摘要。</p>	1 — 14
A	<p>分子进化生物学, 1991 年 11 月; 33 (5): 418 — 425</p> <p>Swanson KW 等: “叶猴胃溶菌酶基因: 趋同试验和阳性选择。”</p> <p>见摘要。</p>	1 — 14
A	<p>自然 1997 年 1 月 9 日; 385 (6612): 151 — 154</p> <p>Messier W,Stewart CB: “灵长类溶菌酶的阵发式适应性进化。”</p> <p>见摘要。</p>	1 — 14